

Prof. dr hab. Elżbieta Paduch-Cichal
Samodzielny Zakład Fitopatologii
Ul. Nowoursynowska 159
02-787 Warszawa

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Zarzyńskiej-Nowak pt.
„Diagnostyka oraz analiza molekularna izolatów wirusa pasiastej mozaiki
jęczmienia (*Barley stripe mosaic virus*, BSMV)”
wykonanej pod kierunkiem
dr hab. Małgorzaty Jeżewskiej, prof. nadzw. IOR-PIB
oraz
dr hab. Beaty Hasiów-Jaroszewskiej, prof. nadzw. IOR-PIB**

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska dotyczy zagadnień związanych ze zmiennością wirusów oraz opracowaniem rzetelnych i czułych metod diagnostycznych pozwalających rozpoznać chorobę rośliny i zidentyfikować jej sprawcę.

Wybrany do badań wirus pasiastej mozaiki jęczmienia (*Barley stripe mosaic virus*, BSMV), należy do rodzaju *Hordeivirus*, rodziny *Vigaviridae*. Wiriony są pałeczkowate. Genomowy ssRNA ma trzy segmenty określane jako α , β , γ . Każdy z segmentów genomu zawarty jest osobnej cząstce, a pełny wirion składa się z trzech typów cząstek, z których każda zawiera jeden z segmentów genomu. BSMV stanowi poważne zagrożenie dla upraw jęczmienia ze względu na powszechność występowania, dużą szkodliwość oraz zdolność przenoszenia z sokiem w okresie wegetacji oraz z nasionami.

Celem tej pracy jest scharakteryzowanie właściwości biologicznych izolatów wirusa oraz analiza zmian ultrastrukturalnych komórek chorych roślin jęczmienia. Mgr Aleksandra Zarzyńska-Nowak przeprowadza wnikliwą charakterystykę molekularną izolatów BSMV. Wykonuje także analizę ewolucji molekularnej patogena w trakcie wielokrotnego pasażowania izolatu BSMV-M na roślinach jęczmienia, analizy filogenetyczne oraz analizy występowania rekombinacji i presji selekcyjnej. Jednocześnie doktorantka podejmuje próbę usprawnienia diagnostyki wirusa szczególnie cenną w stosunku do izolatów łagodnych wirusa, które w Polsce są izolatami dominującymi w roślinach jęczmienia, a w stosunku do których mmunoenzymatyczny test ELISA podobnie jak i technika RT-PCR okazały się mało przydatne.

Uważam, że wybór tematyki badawczej przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej jest zgodny z nowoczesnym kierunkiem rozwoju badań nad wirusami roślin. Podjęta przez mgr Aleksandrę Zarzyńską-Nowak tematyka badawcza jest oryginalna i ważna zarówno dla badań podstawowych, jak i aplikacyjnych.

Recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska obejmuje 119 stron. Układ pracy jest prawidłowy, a treść rozdziałów właściwa. Dysertacja składa się z dziewięciu rozdziałów: Wstęp, Przegląd literatury, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz Spis literatury. W poszczególnych rozdziałach wydzielono podrozdziały i podpodrozdziały. Praca zawiera także streszczenie polsko i angielskojęzyczne oraz wykaz stosowanych skrótów. Uzyskane wyniki są zaprezentowane w 14 tabelach w tekście pracy i na 34 rycinach. Autorka cytuje 207 pozycji literatury krajowej i zagranicznej. Strona ilustracyjna pracy dobrze dokumentuje uzyskane wyniki i jest staranna. Zawiera wyraźnie prezentujące uzyskane wyniki zdjęcia, rysunki, schematy, wykresy i czytelne tabele. Praca napisana jest poprawnym, komunikatywnym językiem, czyta się dość łatwo.

W mojej ocenie w tytuł rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Zarzyńskiej-Nowak nie jest w pełni zgodny z jej treścią. W tytule powinna się znaleźć charakterystykę właściwości biologicznych izolatów wirusa pasiastej mozaiki jęczmienia.

Wstęp – stosunkowo dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienie. Zabrakło jednak wyraźnego wyjaśnienia, dlaczego podjęto próbę poszukiwania nowych metod diagnostycznych?. Dopiero w rozdziale 7. Dyskusja, podrozdział 7.3., Doktorantka uzasadnia, iż cyt. „Ważnym celem rozprawy doktorskiej było opracowanie metod diagnostycznych pozwalających na efektywne wykrywanie izolatów BSMV, szczególnie tych występujących w niskiej koncentracji w tkankach roślinnych”. Nieco wcześniej bo w Rozdziale 2. Przegląd literatury, podrozdział 2.3., czytamy, że wyniki badań prowadzonych przez Jeżewską (2001, 2006), Jeżewską i Trzmiel (2009) oraz Jeżewską i Cajzę (2010) wskazują, że w Polsce wykryto głównie izolaty łagodne BSMV. Przytoczone powyższe informacje winny znaleźć w Rozdziale 1. niniejszej rozprawy. Mgr Aleksandra Zarzyńska-Nowak powołuje się na dane pochodzące z Rocznika Statystycznego z lat 2014-2015 dotyczące łącznej powierzchni upraw zbóż na świecie, powierzchni upraw jęczmienia w Polsce oraz wysokości plonu. Czy były kłopoty z uzyskaniem bardziej aktualnych danych?

Przegląd literatury - liczy 18 stron i porusza wszystkie badane w pracy wątki. Dobór literatury jest zasadny, a sposób cytowania prawidłowy. Uwagi jakie nasunęły mi się w trakcie czytania tego rozdziału są następujące:

- moim zdaniem tytuły podrozdziałów: 2.1., 2.2., 2.3., 2.4., 2.5., 2.6., i 2.9. powinny być uzupełnione o akronim wirusa,
- Strona 16 - Autorka podając klasyfikację wirusa opiera się na danych zawartych w IX Raporcie ICTV z 2012 roku oraz publikacji Kryczyński (2002), w którym autor opisuje zasady kwalifikacji wirusów na podstawie danych zawartych w 7 Raporcie ICTV z roku 2000. Moim zdaniem Doktorantka powinna wykorzystać jako źródło dane zamieszczonych w 10 Raporcie ICTV z 2016 roku, który obecnie dostępny jest jedynie online
 - <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- Strona 17 - zdanie cyt. „ Najczęściej obserwowanym symptomem powodowanym przez BSMV jest..... moim zdaniem nie obserwujemy symptomów powodowanych przez czynnik infekcyjny, ale notujemy reakcje roślin po infekcji przez czynnik infekcyjny. Według Gołębniak (2010) w Fitopatologia. Podstawy fitopatologii, tom 1. Kryczyński i Weber (reds.) PWRiL, Poznań „Objawy właściwe, które są reakcją rośliny na działanie czynników chorobotwórczych, są wynikiem morfologicznych, anatomicznych lub fizjologicznych zmian w roślinie wywołanych przez czynniki chorobotwórcze”.
- Strony 19 i 20 Autorka podając sposoby przenoszenia wirusa pisze „przenoszenie przez nasiona”, wydaje się, że w przypadku tego sposobu rozprzestrzeniania wirusa właściwej byłoby pisać przenoszenie wirusa z nasionami jak podaje Kryczyński (2010) w Fitopatologia. Podstawy fitopatologii, tom 1. Kryczyński i Weber (reds.) PWRiL, Poznań.
- Strona 29 - tytuł podrozdziału 2.7. Zmienność genetyczna RNA wirusów oraz różnicowanie izolatów BSMV nie koresponduje z jego treścią. Autorka omawia przyczyny powstawania nowych wariantów RNA wirusów (mutacje, rekombinacje). Informacje dotyczące różnicowania genetycznego BSMV są bardzo skąpe i ograniczają się jednego do wyników badań z pracy Smith i współautorzy (2014). Brak innych źródeł literaturowych dotyczących tematu,

- Strona 32 - Podrozdział 2.9. Diagnostyka, Doktorantka jedynie wymieniła dotychczas polecane do wykrywania i identyfikacji BSMV metody/techniki. Brak jest jakichkolwiek danych z literatury dotyczących ich skuteczności

Cel pracy - obejmuje 6 wyraźnie określonych zagadnień w tym: analizę właściwości biologicznych BSMV, analizę zmian ultrastrukturalnych komórek jęczmienia porażonych przez wirus, wielostronną molekularną charakterystykę BSMV oraz ocenę przydatności dwóch technik IC-real-time PCR oraz RT-LAMP do wykrywania i identyfikacji łagodnych izolatów wirusa.

Niestety Autorka nie podała ani okresu czasu, w którym badania przeprowadzono, ani ich miejsca.

Materiały - Autorka prowadziła badania z wykorzystaniem dwóch polskich izolatów wirusa pasiastej plamistości jęczmienia wykrytych, zidentyfikowanych i określonych przez Jeżewską (2006) jako polski łagodny izolat: BSMV-M, polski silny izolat : BSMV-R oraz wariant genetyczny BSMV-M/R powstały jako wynik pasażowania izolatu BSMV-M . Zabrakło informacji dlaczego do badań wybrano akurat te izolaty BSMV i jakie było źródło ich pochodzenia?. Jako izolat referencyjny użyto niemiecki, łagodny izolat BSMV-DeM. Czy Doktorantka uznała, że użycie do badań zagranicznego silnego referencyjnego izolatu nie jest zasadne?, czy może Doktorantka miała trudności z jego pozyskaniem?.

Zabrakło także informacji o pochodzeniu użytych w testach 19 gatunków roślin wskaźnikowych oraz nasion 61 odmian jęczmienia.

Metody - Zastosowaną metodykę badań uważam za właściwą dla osiągnięcia zaplanowanych celów badawczych. Przedstawiono kompletne protokoły użytych metod/technik badawczych: test DAC-ELISA, metody elektronomikroskopowe (technika sap-dip, metoda ultracienkich skrawków), metoda inokulacji sokiem, oczyszczania wirusa, techniki RT-PCR wraz z podaniem szczegółowych parametrów reakcji i elektroforetycznego rozdziału jej produktów, ligowania produktów reakcji rt-PCR i transformacji komórek kompetentnych, oczyszczania DNA plazmidowego, sposobu weryfikacji klonowania przy użyciu enzymów restrykcyjnych (*EcoRI* i *NotI*), techniki 5' i 3' RACE, sposób pozyskiwania komórek kompetentnych, techniki IC real-time RT-PCR oraz techniki RT-LAMP. Zaprezentowano sposoby analiz: molekularnej BSMV, zmienności genetycznej, rekombinacji, presji selekcyjnej oraz analizy filogenetyczne w tym zasady konstrukcji drzew pokrewieństwa filogenetycznego. Zakres zastosowanych

metod/technik badawczych wskazuje, że Doktorantka starała się kompleksowo i metodycznie rozwiązać postawione w pracy cele.

Autorka prowadziła badania z wykorzystaniem 4 izolatów wirusa, ale w przypadku tylko 3 izolatów BSMV-M, BSMV-R i BSMV-DeM przeprowadzono charakterystykę właściwości biologicznych i obserwacje zmian ultrastrukturalnych w porażonych komórkach roślin. Jaki był tego powód?.

Uwagi, które nasunęły mi się w trakcie czytania tego rozdziału:

- tytuł podrozdziału 5.3. Test biologiczny powinien brzmieć „Metoda inokulacji sokiem roślin wskaźnikowych”.

Testy biologiczne to rutynowe metody wykrywania i/lub identyfikacji patogenów (głównie wiroidów, wirusów, fitoplazm) z użyciem roślin wskaźnikowych, bioindykatorów (Kryczyński i wsp., 2002. Słownik fitopatologiczny. Hortpress sp. z o.o. Warszawa 2002. 155str.). Doktorantka nie wykrywała BSMV przy użyciu tego testu, a jedynie wykorzystwała go do scharakteryzowania właściwości biologicznych patogena przeprowadzając inokulację sokiem wybranych 13 gatunków roślin jednoliściennych oraz 6 gatunków roślin dwuliściennych,

- w podrozdziałach 5.1., 5.2., 5.3. nie podano celu użycia testu/ metody, ani materiału użytego do badań,
- moim zdaniem metodyki technik biologii molekularnej użytych przez Doktorantkę powinny być opisane w osobnych podrozdziałach. Takie postępowanie skutkowałoby zmiany tytułów podrozdziałów
 - podrozdział 5.6. w miejsce „Wykrywanie BSMV w roślinach proponuję „Technika RT-PCR”, następnie krótka informacja dotycząca celu wykorzystania tej techniki i użyty do badań materiał, a następnie kolejno podpodrozdziały 5.7.1., 5.7.2., 5.7.3., zawierające metodykę
 - podrozdział 5.16. można usunąć, a zawarte w nim podpodrozdziały mogłyby stanowić osobne podrozdziały
 - Immunocapture real-time RT-PCR
 - Technika RT-LAMP

Każdy tak powstały podrozdział opatrzony byłby informacjami dotyczącymi celu wykorzystania danej techniki oraz użytego do badań materiału.

Wyniki – Wynik badań stanowią obszerną część przedstawionej do recenzji dysertacji. Zostały one szczegółowo opracowane i poparte bogatym materiałem zawartym w tabelach i rycinach. Chciałabym wyraźnie zaznaczyć, że przeprowadzone badania były bardzo szerokie i wyjątkowo pracochłonne, zwłaszcza analizy molekularne.

Opis wyników rozpoczyna podrozdział 6.1. „Wykrywanie BSMV w roślinach”. W podpodrozdziale 6.1.1. Autorka pisze o wynikach wykrywania wirusa z zastosowaniem testu DAC-ELISA, a w podpodrozdziale 6.1.2. podaje wyniki otrzymane przy zastosowaniu techniki RT-PCR użytej do weryfikacji danych wspomnianego testu DAC-ELISA. Zamieszczenie tych dwóch podrozdziałów jest dla mnie kompletnie nieuzasadnione. Nie wiem jakie rośliny testowano, ponieważ w rozdziale 4. Materiały podrozdział 4.2., Autorka podaje informacje dotyczące jedynie testowania nasion pochodzących z 61 odmian jęczmienia, wyniki którego prezentuje w rozdziale 6. podrozdziale 6.2, a w rozdziale 7 Dyskusja, podpodrozdział 7.1.1. konfrontuje otrzymane wyniki własne z danymi literatury odnoszące się do wykrywania BSMV w nasionach, a nie w roślinach.

Kolejny podrozdział 6.2. „Identyfikacja wirusa w nasionach jęczmienia”. Moim zdaniem tytuł powinien być: „Wykrywanie i identyfikacja BSMV w nasionach jęczmienia przy użyciu testu DAC-ELISA”. Wśród 61 testowanych polskich i zagranicznych odmian jęczmienia 26 było porażonych przez łagodne izolaty wirusa. Czy w pozostałych 35 testowanych odmianach wykryto silne izolaty wirusa, czy być może były one wolne od BSMV? Mgr Aleksandra Zarzyńska-Nowak jedynie stwierdza, że wirus pasiastej mozaiki pszenicy wykrywano w większości odmian polskich i niemieckich. Ponadto nie wskazuje, które z nich to odmiany polskie, a które to odmiany niemieckie?

Doktorantka na podstawie obserwacji reakcji 13 gatunków roślin jednoliściennych oraz 6 gatunków roślin dwuliściennych po inokulacji mechanicznej sokiem każdym z badanych izolatów BSMV- izolat BSMV-M, BSMV-R i BSMV-De-M stwierdziła różnice we właściwościach biologicznych badanych izolatów wirusa. Wyraźnie silniejszą reakcję roślin notowano po inokulacji izolatem BSMV-R w porównaniu do reakcji po inokulacji izolatem BSMV-De-M. Izolat łagodny infekował jedynie 6 gatunków roślin testowych, na których rozwijała się delikatna mozaika, lub pojedyncze drobne lokalne plamki.

Przy użyciu techniki sap-dip możliwa była obserwacja w soku z jęczmienia (jaka odmiana-brak danych) porażonych każdym z badanych izolatów: BSMV-M, BSMS-R lub BSMV-De-M typowych dla rodzaju *Hordeivirus* cząstek. Dodatkowo ustalono różną

koncentracje cząstek wirusa w zależności od izolatu. Była on wyraźnie wyższa dla izolatu BSMV-R w porównaniu do pozostałych łagodnych izolatów.

Bardzo ciekawe są wyniki badań ujawniające zmiany ultrastrukturalne w komórkach jęczmienia (jaka odmiana-brak danych) porażonych każdym z badanych izolatów BSMV. W komórkach roślin inokulowanych BSMV-M nie obserwowano żadnych istotnych zmian ultrastrukturalnych w przeciwieństwie do zmian (wpuklanie się błony komórkowej do wnętrza komórki, obecność w cytoplazmie mikrociał, inkluzji błoniastych, wybrzuszeń cytoplazmy, zmiany kształtu mitochondriów, obecność pęcherzy wewnątrz chloroplastów) widocznych po inokulacji BSMV-R lub BSMV-De-M. Na szczególne wyróżnienie zasługują zaprezentowane przez Doktorantkę bardzo dobrej jakości zdjęcia prezentujące cząstki BSMV oraz zmiany ultrastrukturalne w komórkach chorych roślin.

Znaczną część uzyskanych wyników stanowi charakterystyka molekularna wykonana tym razem w stosunku izolatów BSMV-M, BSMV-R i BSMV-De-M i BSMV-M/R. Autorka przeprowadziła cały szereg badań dotyczących charakterystyki molekularnej izolatów wirusa i w tym zakresie mają one charakter nowatorski, są bardzo ważne zarówno z poznawczego jak i praktycznego punktu widzenia. Mgr Zarzyńska-Nowak dla określenia pełnej sekwencji genomu izolatów BSMV-M, BSMV-R, BSMV-De-M i BSMV-M/R, co należy uznać za szczególnie ważne. Zaprojektowała 47 par własnych starterów, wykorzystwała je do przeprowadzenia reakcji PCR, której produkty wklonowano do wektorów, a następnie sekwencjonowano wyizolowane plazmidy zawierające kopie fragmentów poszczególnych genów analizowanych izolatów wirusa. Uzyskane wszystkie sekwencje dla każdego z 4 izolatów zostały złożone i w ten sposób otrzymano pełne sekwencje genomu izolatów BSMV-M, BSMV-R, BSMV-M/R, BSMV-De-M i BSMV-M/R. które zdeponowano w banku genów. W podpodrozdziale 6.4.2., Doktorantka przeprowadza analiza pełnych sekwencji genomu jedynie dla izolatów BSMV-M, BSMV-R, BSMV-De-M, natomiast dla izolatu BSMV-M/R nieco dalej w podpodrozdziale 6.4.4.. Wyniki tych analiz potwierdziły organizację genomu 4 badanych izolatów jako typową dla rodzaju *Hordeivirus*. W podpodrozdziale 6.4.3, Autorka podaje wyniki bioinformatycznej analizy otrzymanych sekwencji genomów dla trzech izolatów BSMV-M, BSMV-R i BSMV-De-M z sekwencjami genomów z bazy GenBank, natomiast osobno w podpodrozdziale 6.4.4 dla izolatu BSMV-M/R. Moim zdaniem dla porządku w przypadku wszystkich 4 izolatów wirusa wyniki dotyczące analizy pełnych sekwencji genomu, analizy zmienności genetycznej powinny zostać wspólnie omówione, tym

bardziej, że w podpodrozdziale 6.4.6. analiza pokrewieństwa filogenetycznego została dokonana w stosunku do 4 izolatów BSMV.

Na podstawie wyników analizy filogenetycznej przeprowadzonej w oparciu o sekwencje nukleotydów (nt) i aminokwasów (aa) regionów kodujących białka α a, CP, TGBp1, TGBp2, TGBp3, γ a i γ b izolatów BSMV-M, BSMV-R, BSMV-M/R i BSMV-De-M Doktorantka stwierdziła bliskie pokrewieństwo polskich izolatów BSMV-M, BSMV-R, BSMV-M/R na poziomie 96-99,7% (80 str, podpodrozdział 6.4.6.) lub na poziomie 99,2-100 (98 str, podrozdział 7.3.), zaś dla izolatu silnego BSMV-R i izolatu łagodnego BSMV-M wyniosło 97,4-100%. Wyniki analizy filogenetycznej wskazują także na bliskie podobieństwo izolatu niemieckiego BSMV-De-M do badanych polskich izolatów wirusa, co według Doktorantki może być związane z bliskim geograficznie miejscem ich pozyskania.

Mgr Zarzyńska-Nowak przeprowadziła także analizy możliwości występowania rekombinacji, rodzaju i wpływu presji selekcyjnej w stosunku do wszystkich regionów kodujących w genomie izolatów BSMV-M, BSMV-R i BSMV-De-M. Czy do analizy został także włączony izolat BSMV-M/R?. Nie stwierdziła wpływu pozytywnej presji selekcyjnej, ale wykazała, że najwięcej kodonów podlegało negatywnej czyli oczyszczającej selekcji, dla genów CP, TGBp2 i γ a, zaś najmniej dla genów TGBp3 i γ b. Uważa się, że negatywna presja selekcyjna atakuje kodony, których zmiana może wpływać niekorzystnie na właściwości wirusa. Zidentyfikowała także kodony, które mogą podlegać neutralnej presji selekcyjnej.

Bardzo ciekawe są wyniki badań dotyczących ewolucji molekularnej łagodnego izolatu BSMV w celu ustalenia możliwości tworzenia nowych wariantów wirusa o odmiennych od dotychczas opisanych właściwościach biologicznych. Po wykonaniu 10 cykli pasażu izolatu BSMV-M na 3 rośliny jęczmienia odm Annabell, każda z nich była odrębną linią ewolucyjną, jedynie dla trzeciej linii po 4 cyklu Doktorantka zanotowała zmianę reakcji roślin. Łagodną mozaikę na blaszkach liściowych zastąpiła silna chloroza utrzymująca się do końca doświadczenia. Otrzymany nowy wariant genetyczny BSMV-M/R był w wyższej koncentracji w roślinach, a ponadto łatwo przenosił się mechanicznie z sokiem, natomiast słabiej z nasionami w porównaniu to formy wyjściowej. Otrzymano pełną sekwencję genomu BSMV-M/R, która składała się z trzech części ssRNA i zawierała 7 regionów kodujących, podobnie jak w przypadku izolatów BSMV-M, BSMV-R i BSMV-De-M. Sekwencja genomu wariantu BSMV-M/R była podobna w stosunku do sekwencji genomu izolatu BSMV-M w 98,1%, a izolatu BSMV-R w 99,46%. Ponadto, Doktorantka wykonała analizę presji

selekcyjnej o czym dowiadujemy się dopiero po przeczytaniu rozdziału 6. Dyskusja (str 96-97), w stosunku do wszystkich regionów kodujących w genomie izolatów BSMV-M/R rodzaju i wpływu presji selekcyjnej, której wyniki były zbieżne z otrzymanymi dla izolatów BSMV-M, BSMV-R i BSMV-De-M.

Mgr Aleksandra Zarzyńska-Nowak wykazała przydatność techniki IC-real-time RT-PCR oraz techniki RT-LAMP do wykrywania i identyfikacji BSMV w materiale roślinnym. W rozdziale 5. Metody, podpodrozdział 5.16.1., że testowano 250 nasion pochodzących z jęczmienia porażonego BSMV-M, ale nie podano co to był za materiał (źródła pochodzenia, odmiany). Ponadto brak jest jakichkolwiek danych dotyczących materiału testowanego (źródło pochodzenia, odmiany, liczba)przy użyciu techniki RT-LAMP. Wymaga to uzupełnienia przy przygotowywaniu publikacji. Podobnie uzupełnienia wymagają prezentowane wyniki dotyczące diagnozy materiału z użyciem techniki IC-real-time RT-PCR, a zwłaszcza techniki RT-LAMP. Pomimo wskazanych niedoskonałości uważam, że podjęcie przez Doktorantkę prób znalezienia nowych, bardziej skutecznych niż zalecane technik wykrywania w nasionach zwłaszcza łagodnych izolatów BSMV jest zasadne i powinno zostać wykorzystane do rutynowej diagnostyki wirusa przez służby fitosanitarne oraz uwzględnione w procedurach zalecanych przez EPPO. Autorka wykazała, że technika IC-real-time RT-PCR jest 100-krotnie czulsza niż technika RT-PCR, a czułość techniki RT-LAMP przewyższa 10-krotnie czułość techniki RT-PCR.

Dyskusja – Doktorantka komentuje kolejno wszystkie otrzymane wyniki. Jest tu nie tylko skonfrontowanie ich ze wcześniejszymi źródłami dotyczącymi literatury tematu, ale i własna interpretacja niektórych wyników. Mam uwagi , które mi się nasunęły w trakcie lektury tego rozdziału.

- wyniki badań dotyczących wykrywania BSMV przy użyciu testu DAC-ELISA (podpodrozdział 7.1.1.) oraz adaptacji techniki IC real-time-PCR i techniki RT-LAMP do wykrywania BSMV (podrozdział 7.3.) powinny być wspólnie przedyskutowane,
- tytuł podpodrozdziału 7.1.2. Zakres roślin gospodarzy i wywoływane objawy winien być raczej „Reakcja roślin wskaźnikowych po inokulacji BSMV”,
- niczym jest nieuzasadnione w rozdziale 7. Dyskusja, zamieszczanie metodyki doświadczeń, nawet w wersji skróconej- podrozdział 7.2., podpodrozdział 7.2.3. – str. 96,

- brak jakichkolwiek danych literaturowych dotyczących wykorzystania techniki RT-LAMP w diagnostyce roślin porażonych BSMV przez innych badaczy. Czy Doktorantka jako pierwsza tą technikę proponuje? Należałoby o tym napisać,
- brak jakichkolwiek danych literaturowych dotyczących wykorzystania techniki RT-LAMP w diagnostyce roślin porażonych BSMV przez innych badaczy. Czy Doktorantka jako pierwsza tą technikę proponuje?. Należałoby o tym napisać,
- z tekstu na stronie 99 (podrozdział 7.3.) dotyczącego wykorzystania techniki IC real-time-PCR do wykrywania i BSMV i prac związanych z porównaniem czułości testu DAC-ELISA i techniki IC real-time-PCR wynika, że rezultaty tych badań zostały wcześniej przez Doktorantkę opublikowane (Zarzyńska i współautorzy 2014). Czy od tego czasu nie ukazały się prace innych badaczy stosujących tą technikę w diagnostyce BSMV, jeśli jej czułość jest 100-krotnie wyższa w stosunku do testu DAC-ELISA?

Wnioski - Autorka wyciągnęła 6 wniosków. Mam uwagi do przedstawionych przez Doktorantkę wniosków. Jedynie wniosek numer 6 został prawidłowo sformułowany. Pozostałe wnioski prezentują wynik przeprowadzonych w ramach pracy doświadczeń i wymagają przerehabilitacji.

Spis pozycji literaturowych odnośniki są wykonane przez Doktorantkę poprawnie. Nie znalazłam czterech pozycji literatury podanej w rozdziale 9. Spis literatury

1. Bragg i wsp. (2004)
2. CABI/EPPO (1998)
3. CABI/EPPO (1999)
4. Lane i Heide (1974)

Podczas czytania pracy nasunęło mi się kilka uwag:

- bardziej uniwersalnym sposobem byłoby słowa Rycina zastąpić słowem
 - Fotografia - Fot. 1., 2., 3., 4., 5., 9., 10., 11., 12., 13., 14., 15., 17., 21b., 31a., 32., 34.
 - Rysunek - Rys. 8., 21a., 22., 23., 24., 25., 26., 27., 28., 29.
 - Schemat 6., 7., 16., 18., 19., 20.,
 - Wykres - Wyk. 30., 31b., 33.,
- należałoby pisać przy użyciu metody, a nie metodą - np. str. 65
- należałoby pisać produkty reakcji PCR, a nie produkt PCR - np. str. 64, 73,

- należałoby ujednolicić terminy technika, test, metoda, np.
metoda RT-LAMP - str. 85
technika RT-LAMP str. 86, 100
test RT-LAMP str. 100

Podsumowując, pragnę podkreślić, że wszystkie przytoczone uwagi, pytania czy wskazane usterki głównie redakcyjne w niczym nie umniejszają mojej oceny merytorycznej rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Zarzyńskiej-Nowak, a mają na celu jedynie wskazanie Autorce miejsc wartych zweryfikowania przed opublikowaniem wyników w czasopismach naukowych.

Przedstawiona rozprawa doktorska mgr Aleksandry Zarzyńskiej-Nowak to bardzo obszerne, szczegółowe zawierające ogromną masę wyników opracowanie obejmujące dużą porcję dobrej wirusologicznej roboty (bardzo cenne otrzymanie pełnych genomów 4 izolatów wirusa). Wykonanie i opracowanie takiej liczby danych jest rzeczywiście wyjątkowo imponujące. Podjęte bardzo wszechstronne badania dały odpowiedź na szereg pytań, a jednocześnie postawiły nowe. Przedstawiona dysertacja wskazuje na opanowanie przez Aleksandrę Zarzyńską-Nowak warsztatu badawczego, zarówno na poziomie klasycznej fitopatologii-wirusologii jak i molekularnej wirusologii roślin (genomiki) i bioinformatyki (analizy *in silico*) oraz umiejętnym ich wykorzystaniu w trakcie realizacji badań. Praca ma bardzo dużą wartość poznawczą i wnosi nowe wartości do światowej nauki. Posiada także znaczenie praktyczne. Otrzymane wyniki z całą pewnością mogą zostać wykorzystane do przygotowania publikacji zgłaszanych do wysoko punktowanych czasopism naukowych z zakresu fitopatologii i wirusologii.

Praca w pełni spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i stawiam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin-Państwowy Instytut Badawczy o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Aleksandry Zarzyńskiej-Nowak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Uważam, że praca zasługuje na nagrodę i wnoszę o wyróżnienie pracy mgr Aleksandry Zarzyńskiej-Nowak przez Radę Naukową Instytutu Ochrony Roślin.

Warszawa, 5.05.2017



Prof. dr hab. Elżbieta Paduch-Cichal